

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ISADORA POZZETTI SIBA

**Avaliação pré-clínica do potencial efeito antidepressivo  
da miricitrina em modelos animais**

**CURITIBA**

**2013**

ISADORA POZZETTI SIBA

**Avaliação pré-clínica do potencial efeito antidepressivo  
da miricitrina em modelos animais**

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado ao Curso de Ciências  
Biológicas da Universidade Federal  
do Paraná como requisito à  
obtenção do título de Bacharel em  
Ciências Biológicas.

Orientador: Roberto Andreatini

**CURITIBA**

**2013**

## RESUMO:

Tem sido proposto que a inibição do óxido nítrico (NO) tem apresentado efeito antidepressivo em modelos animais, dados estes observados em estudos com animais onde a diminuição da atividade nitrinérgica no hipocampo se mostrou efetiva na reversão do comportamento depressivo. A miricitrina é um flavonóide com ação inibitória sobre a PKC (proteína quinase C) e o NO. Estudos já demonstraram um potencial efeito antinociceptivo, antipsicótico e ansiolítico da miricitrina, podendo também apresentar um potencial efeito antidepressivo, sendo este o alvo do presente trabalho. No presente estudo, os animais (camundongos swiss) foram divididos em dois grupos (estresse e controle), sendo que o grupo estresse foi induzido à anedonia pelo estresse brando repetido e imprevisível (privação de água, comida, constante claro ou escuro, cepilho úmido, caixa inclinada) por 5 semanas. O teste da preferência de sacarose (concentração de 1%) foi realizado em cada semana de estresse em ambos os grupos. Após a indução da anedonia (redução da preferência por solução de sacarose) os animais foram submetidos ao teste de preferência de sacarose, nado forçado (NF) e campo aberto (CA), para o estabelecimento dos parâmetros basais de imobilidade (no teste de NF) e locomoção (no teste de CA). O teste de suspensão pela cauda (TST) foi aplicado posteriormente, em outro grupo de animais, que também passaram pela indução da anedonia mensurada pela preferência de sacarose; após o teste, os camundongos foram sacrificados e suas glândulas adrenais retiradas e pesadas, pois animais com comportamento depressivo possuem hipertrofia das adrenais.

Os animais receberam um tratamento por 14 dias com salina (controle), imipramina (20 mg/kg, ip - controle positivo) e miricitrina (10mg/kg, ip), com testes semanais de preferência de sacarose, NF/TST e CA. Como esperado, a imipramina reverteu o comportamento tipo depressivo (aumento na imobilidade e anedonia), assim como reverteu a hipertrofia da adrenal, todos induzidos pelo estresse imprevisível. A miricitrina também reverteu esse comportamento, diminuindo o tempo de imobilidade no teste do nado forçado e aumentando a preferência pela solução de sacarose, revertendo a anedonia induzida e a hipertrofia da adrenal. Portanto, ambas as drogas foram efetivas nesses testes. Nenhum tratamento obteve diferença significativa do grupo controle no teste do campo aberto, no qual se pode constatar que a atividade locomotora não foi alterada. Os resultados obtidos suportam a hipótese de que a miricitrina é um potencial antidepressivo em doses que não prejudicam a atividade locomotora. Os resultados obtidos com a imipramina validam os procedimentos e a eficácia dos testes realizados.

## **ABSTRACT:**

It has been proposed that inhibition of nitric oxide (NO) have shown antidepressant effect in animal models, these data observed in animal studies where decreased nitrinergic activity in the hippocampus was effective in reversing the behavioral depressant. The miricitrina is a flavonoid with an inhibitory effect on PKC (protein kinase C) and NO. Studies have shown a potential antinociceptive, antipsychotic and anxiolytic effects of miricitrina, and may also present a potential antidepressant effect, which is the target of this work. In the present study, animals (swiss mice) were divided into two groups (control and stress), whereas the group stress was induced anhedonia by the repeated and unpredictable mild stress (deprivation of food, water, constant light or dark, wet shaver, inclined box) for 5 weeks. The sucrose preference test (1% concentration) was performed each week of stress in both groups. After induction of anhedonia (reduced preference for sucrose solution) animals were subjected to sucrose preference test, forced swimming (NF) and open field (CA), to establish the baseline parameters of immobility (in the NF test) and locomotion (the CA test). The tail suspension test (TST) was applied later, in another group of animals, which also passed by inducing anhedonia measured by the preference of sucrose, and after the test, the mice were sacrificed and their adrenal glands removed and weighed, because animals with depressive behavior have hypertrophy of the adrenals.

The animals received treatment for 14 days with saline (control), imipramine (20 mg/kg, ip - positive control) and miricitrina (10mg/kg, ip), with weekly sucrose preference tests, NF/CA and TST. As expected, imipramine reversed depressive-like behavior (increased immobility and anhedonia) and reversed the adrenal hypertrophy, all induced by unpredictable stress. The miricitrina also reversed this behavior, reducing the immobility time in the forced swimming test and increases the preference for sucrose solution, reversing the induced anhedonia and adrenal hypertrophy. Therefore, both drugs were effective in these tests. No treatment had significant difference from the control group in the open field test, in which one can see that the locomotor activity was not altered. The results support the hypothesis that miricitrina is an antidepressant potential in doses that didn't impair locomotor activity. The results obtained with imipramine validate the effectiveness of the procedures and tests.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	7
2. OBJETIVOS.....	15
2.1. Objetivos Gerais.....	15
2.2. Objetivos Específicos.....	15
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	16
3.1. Animais.....	16
3.2. Drogas Utilizadas.....	16
3.3. Modelos Comportamentais.....	16
3.3.1. Preferência por solução de sacarose.....	16
3.3.2. Anedonia induzida por estresse brando repetido e imprevisível.....	17
3.3.3. Teste do campo aberto.....	18
3.3.4. Teste de natação forçada.....	18
3.3.5. Teste de suspensão pela cauda.....	19
3.3.6. Pesagem da glândula adrenal.....	19
3.4. Análise Estatística.....	20
4. RESULTADOS.....	21
4.1. Determinação da melhor concentração de sacarose.....	21
4.2. Análise da indução da anedonia por estresse brando mensurada pela preferência de sacarose.....	21
4.3. Análise do efeito dos tratamentos no teste de preferência por solução de sacarose.....	22
4.4. Análise do efeito dos tratamentos no teste do campo aberto.....	23
4.5. Análise do efeito dos tratamentos no teste do nado forçado.....	24
4.6. Análise do efeito dos tratamentos no teste de suspensão pela cauda.....	25
4.7. Pesagem da glândula adrenal de camundongos submetidos a estresse brando repetido e imprevisível.....	26
5. DISCUSSÃO.....	28

6. CONCLUSÃO.....	33
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	34

## 1. INTRODUÇÃO:

A depressão é uma das mais prevalentes doenças psiquiátrica que afeta a população. Estima-se que ao menos 16% da população geral irá sofrer deste transtorno alguma vez na vida, sendo que as mulheres são duas vezes mais afetadas do que os homens (Capriotti, 2006). Esse transtorno causa grande prejuízo físico e social ao indivíduo, pois causa alterações na cognição e no metabolismo (Krishnan e Nestler, 2008). Um tipo de depressão típica é a depressão maior, um transtorno debilitante e recorrente, que possui um elevado risco de vida e um grande custo social psiquiátrico na sociedade atual (Millan, 2006). Esta patologia é caracterizada por um ou mais episódios depressivos com pelo menos 2 semanas de humor deprimido ou uma diminuição significativa de interesse nas atividades que antes eram prazerosas (anedonia), acompanhados de pelo menos quatro (três se humor deprimido e anedonia estiverem presentes) sintomas adicionais de depressão: perda ou aumento de apetite (causando alterações no peso), insônia ou hipersonia, alterações na psicomotricidade (agitação ou lentidão nos movimentos), fadiga ou perda de energia, dificuldade de concentração ou indecisão, sentimentos de inutilidade e pensamentos suicidas (DSM-IV).

O tratamento com antidepressivos é eficaz, mas apesar da grande variedade destes fármacos, apenas 70% a 80% dos pacientes respondem ao tratamento. Além disso, muitos pacientes não aderem totalmente ao tratamento, pois os sintomas positivos dos medicamentos (efeitos antidepressivos) muitas vezes demoram a aparecer, levando de cinco a oito semanas, deixando com que os efeitos colaterais geralmente sejam os primeiros a se manifestar (como, por exemplo, hipersonia, ganho ou perda de peso e náuseas), fazendo com que muitos pacientes deixem o tratamento (Souza, 1999; Machado, et al. 2009). Devido à complexidade do transtorno, muitas teorias surgiram na tentativa de se explicar as causas da depressão, sendo que uma das mais antigas e ainda estudadas é teoria monoaminérgica da depressão, base da maioria dos medicamentos antidepressivos atualmente utilizados.

A base desta teoria consiste na redução de monoaminas, esta inicialmente baseada na deficiência da noradrenalina (Shildkraut, et al. 1965); a formulação foi originalmente baseada em observações de que a maioria dos antidepressivos agia

como inibidores de transportadores da serotonina e da noradrenalina no neurônio pré-sináptico (como por exemplo, a imipramina), portanto, aumentando a neurotransmissão monoaminérgica (Glowinski e Axelrod, 1964; Ross e Renyi, 1969). Estudos recentes com a reserpina, um anti-hipertensivo que depleta a quantidade de monoaminas, principalmente de noradrenalina (pois bloqueia o transporte para as vesículas intracelulares), leva o paciente a um quadro de depressão (Gronli, *et al.* 2007). O envolvimento da noradrenalina e da serotonina na patologia da depressão é bem documentado, mas estudos com pacientes depressivos têm relatado uma diminuição de outra monoamina, a dopamina (Rampello *et al.* 1991; Bonhomme e Esposito, 1998; Anand e Charney, 2000; Hirschfeld, 2000); além disto, Finan e Smith (2012) observaram que em resposta ao estresse crônico, a desregulação da neurotransmissão dopaminérgica mesolímbica contribui para o desenvolvimento e persistência da depressão (Treadway e Zald, 2011).

No entanto, estas monoaminas possuem correlação com outro neurotransmissor amplamente abordado na patogênese da depressão maior, o óxido nítrico (NO); este é um gás solúvel que possui o menor peso molecular de qualquer produto secretado por células de mamíferos, por isto, difunde-se livremente pelas membranas plasmáticas, além de, diferentemente das monoaminas, não ser armazenado em vesículas sinápticas e nem ser lançado por processos de exocitose (Yun, 1997). Esta reação é dependente da ativação dos receptores NMDA (N-Metil-D-Aspartato), que devido ao influxo de cálcio, interagem com a calmodulina, induzindo a ativação da óxido nítrico sintase (NOs) (Bettio, *et al.* 2012). Esta enzima (a qual está presente nos tecidos e neurônios periféricos) catalisa a reação entre o aminoácido L-arginina e O<sub>2</sub> molecular, resultando em L-citrulina e NO (Gally *et al.* 1990; Moncada *et al.* 1991). Este gás possui uma meia-vida curta, e por ser um agente oxidante ou redutor, dependendo do meio em que se encontra, pode rapidamente ser destruído pelo oxigênio, resultando em nitrito e nitrato (Kiechele *et al.* 1993), ou por ser um radical livre, o NO reage rapidamente com um superóxido radical para formar uma das espécies mais reativas de todas, o peroxinitrito, que pode causar estresse oxidativo se este não for devidamente eliminado por mecanismos de defesa antioxidantes (Ceylan, *et al.* 2011; Steinert, *et al.* 2010). Quanto à importância do NO, ele age tanto como um neurotransmissor ou como mensageiro secundário, envolvendo-se em numerosas funções fisiológicas como a



regulação do sistema cerebrovascular, plasticidade sináptica, e agindo como modulador no comportamento agressivo, de aprendizado e percepção da dor; sendo assim, pode-se dizer que a especificidade de suas reações é mínima (Ceylan, *et al.* 2011; Esplugues, 2002). Muitos estudos têm demonstrado o papel do NO na neurobiologia da depressão, principalmente por estar correlacionado com a serotonina, a noradrenalina e a dopamina; um exemplo de que a serotonina e a dopamina são moduladas pelo NO foi demonstrada por Wegener e colaboradores (2000), no qual a administração de inibidores da NOs aumenta a concentração extracelular de serotonina e dopamina no hipocampo ventral de ratos, uma das áreas mais envolvidas com a patofisiologia da depressão; quando se aplicou L-arginina, um precursor da NOs, ocorreu um efeito oposto, sendo então demonstrado que o NO endógeno age como um controle negativo sobre os níveis de serotonina e dopamina no hipocampo (Dhir, 2011; Harkin, *et al.* 2003; Fossier, *et al.* 1999). Ainda é importante ressaltar que estudos têm demonstrado a importância do sistema nitrinérgico na modulação da atividade serotoninérgica, sendo que o NO modularia a liberação e inibiria a enzima de síntese da serotonina (Kuhn e Arthur, 1996), inativando a própria serotonina (Fossier *et al.* 1999); já em relação à dopamina, foi demonstrado que o NO inibe a captação de dopamina e inibidores da NOs, incluindo a miricitrina, inibem comportamentos mediados pela dopamina. (Pereira *et al.* 2011). Quanto à noradrenalina, alguns estudos têm demonstrado sua relação com o NO, como o tramadol, um opióide inibidor da recaptação de noradrenalina e serotonina, obtém seus efeitos antidepressivos potencializados por inibidores da NOs (Jesse, *et al.* 2008). Com base nos dados acima, uma vez que os antidepressivos são largamente usados em clínicas, e que estes são eficazes, a ideia de que a inibição da NOs possui efeito antidepressivo é validada por dados existentes em humanos, pois em pacientes depressivos há uma maior produção de NO (Suzuki, *et al.* 2001; Lee, *et al.* 2006). Estudos também demonstraram que pacientes com depressão apresentam deficiência de magnésio, no qual pode resultar no aumento da produção de NO, induzindo o paciente a sintomas depressivos, suportando a hipótese acima (Eby, 2006).

Sabe-se atualmente que as alterações em neurotransmissores (como as monoaminas citadas anteriormente) não são os únicos fatores envolvidos na patofisiologia da depressão, uma vez que a hiper-responsividade do eixo

hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) ao estresse foi registrada em pacientes depressivos (Kandel, 2000); este fato indica que o desenvolvimento da depressão não é decorrente apenas de fatores genéticos (25% de influência no transtorno), mas também de fatores ambientais (75% de participação no desenvolvimento da doença), como postulado por Henn e Vollmaryr (2004). O estresse pode ser visto como um fenômeno duplo, pois ao mesmo tempo em que esta é uma resposta essencial à sobrevivência do indivíduo, pode causar efeitos adversos ao mesmo, devido a uma instabilidade na secreção de hormônios, alterando a homeostase cerebral (Sapolsky, 1996; Stephen, *et al.* 2005). Esta resposta adaptativa do organismo, denominada por Szabo (1985) como “síndrome geral da adaptação”, responderia a fatores estressores tanto externos quando internos com uma série de respostas fisiológicas compensatórias orquestradas no intuito de manter a homeostasia, sendo que o principal centro de resposta e adaptação seria então o eixo HPA. A inadaptação (alostasia) a tais fatores seria um fator que poderia desencadear o desenvolvimento da depressão. Segundo esta teoria, fatores genéticos precipitariam uma maior responsividade a fatores estressores e a exposição a esses fatores levaria a uma resposta aumentada ao estresse pela inabilidade do sistema em se auto-inibir (Maier e Watkins, 1998; Stephen, *et al.* 2005; Bueno, *et al.* 2008). Diante de um estímulo estressor, as células dos núcleos paraventriculares hipotalâmicos secretam o hormônio liberador de corticotrofina (CRH) – o principal coordenador da resposta do eixo HPA – na microcirculação hipofisária, sendo que o CRH na hipófise levará a liberação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) que, ao agir sobre a adrenal, levará a produção de glicocorticoides. Os glicocorticoides por sua vez irão modular a atividade do eixo HPA, promovendo um estímulo inibitório à produção de CRH e ACTH através de sua ação no hipocampo e hipotálamo (Juruena, *et al.* 2004; Aguilera *et al.* 2007). Além destas áreas, o estímulo estressor estende-se ao sistema límbico, uma vez que este sintetiza neurotransmissores como a serotonina e a noradrenalina, ambos apresentando um efeito estimulador sobre a liberação de CRH (Owens e Nemeroff, 1993; Nemeroff, 2002). Caso haja falha em tal retroalimentação negativa, o sistema não será então capaz de cessar sua atividade e esse estado de hiperatividade levaria a hipo-responsividade dos receptores para CRH, aumento dos níveis de cortisol, hipertrofia da adrenal, alterações metabólicas, alteração na função tireoidiana e sexual, desequilíbrio no sistema imune e diminuição de volume do

hipocampo com consequente prejuízo cognitivo (Tsigos e Chrousos, 2002). É importante ressaltar que a hipertrofia da adrenal provavelmente explica porque a resposta do cortisol ao CRH é similar em indivíduos deprimidos e em controles, já que a glândula adrenal aumentada é capaz de compensar a resposta diminuída de ACTH ao CRH, geralmente observada em pacientes deprimidos (Nemeroff, 1996; Shirayama *et al.* 2002; Saarelainen *et al.* 2003; Sairanen *et al.* 2005; Berton e Nestler 2006; Li *et al.* 2008).

Os modelos animais são recursos indispensáveis na identificação de novos fármacos antidepressivos mais efetivos, bem como no melhor entendimento da fisiopatologia deste transtorno. Para isto, modelos animais de depressão têm sido desenvolvidos para que os resultados obtidos sejam extrapoláveis para os humanos. Infelizmente esses modelos apresentam certas restrições uma vez que são incapazes de mimetizar características mais psicológicas, como sentimento de culpa, ideação suicida e humor depressivo. Em razão disto, há alguns critérios, desenvolvidos por McKinney e Bunney em 1969, que sempre devem ser lembrados quando se trata de modelos animais de depressão, possibilitando então a criação de um paralelo entre o comportamento do animal (embora carente de todos os sintomas da doença) e a patologia em si. Por exemplo, o modelo animal deve ser razoavelmente análogo quanto à sintomatologia e manifestações da doença em humanos (validade de face); é necessário que o comportamento induzido no animal seja revertido ou prevenido pelas mesmas modalidades de tratamento efetivas na depressão clínica (validade preditiva); um modelo também pode apresentar validade de constructo, ou seja, este produz os mecanismos neurobiológicos da doença – ao menos uma destas modalidades deve estar presente para que o modelo seja validado (Fries e Magalhães, 2010). Dentre estes parâmetros a serem validados, pode-se dizer que os testes mais antigos para o comportamento tipo depressivo apresentam normalmente validade preditiva, como é o caso do teste de nado forçado (Nestler, *et al.* 2002a,b). Neste teste os animais são submetidos a uma situação inescapável e é avaliado o tempo de imobilidade, que é tomado como comportamento tipo depressivo e fármacos antidepressivos são efetivos em diminuir a imobilidade (Porsolt, *et al.*, 1977a,b; Cryan *et al.* 2002; Skalisz *et al.* 2004; Raupp *et al.* 2008).

O modelo de estresse brando repetido e imprevisível (*Chronic mild stress* – CMS) é amplamente utilizado para o estudo da depressão (Willner *et al.* 1997), pois mimetiza muitas das alterações neurobiológicas encontradas em pacientes com depressão, como diminuição do BDNF (pela inibição da expressão de sua proteína, que pode ocorrer em consequência da inativação dos receptores 5-HT), hipertrofia da adrenal e aumento nos níveis de estresse oxidativo – assim sendo, o CMS apresenta uma boa validade de constructo e, por induzir um comportamento anedônico nos animais (que consiste na diminuição de um efeito reforçador positivo, neste caso, perda pela preferência de sacarose) e pela reversão deste comportamento ser possível com os mesmos tratamentos utilizados em humanos, pode-se considerar que tal modelo possui também validade de face e preditiva (Mattson, *et al.* 2004; Tsigos e Chrousos, 2002; Gronli, *et al.* 2006; McArthur e Borsini, 2006; Casarotto e Andreatini, 2007). Este modelo se baseia em induzir anedonia (um dos comportamentos marcantes da depressão) no animal submetendo-o a uma variedade de situações estressoras diariamente, e tal comportamento é mensurado pelo teste de consumo de sacarose (McArthur e Borsini, 2006); a ligação entre a preferência por soluções doces e o estado hedônico foi baseada na evidência de que a informação visceral positiva e negativa possui alto impacto nos processos cognitivos e comportamentais (Berntson, *et al.* 2003). A exposição de roedores a fatores estressores de uma maneira continuada mimetiza muitos dos aspectos observados em pacientes depressivos, como aumento dos níveis de corticosterona plasmática (Kubera *et al.* 2001; Joels *et al.* 2004) com consequente hipertrofia da adrenal (Reul *et al.* 1993), assim como ocorrem alterações de sono REM (Moreau *et al.* 1995); o aumento da nNOS (Yazir, *et al.* 2012) e diminuição da neurogênese hipocampal (Joels *et al.* 2004) também foram relatados. É importante ressaltar que as alterações induzidas pelo CMS são revertidas apenas pelo tratamento repetido (crônico), enquanto que o tratamento agudo não é efetivo.

O teste de campo aberto é bem validado e tem sido utilizado como indicativo da atividade motora do animal. A ambulação neste projeto será avaliada para verificar se o tempo de imobilidade no nado forçado é decorrente de alterações na locomoção do animal causadas pela dose dos tratamentos aplicados (Walsh e Cummins, 1976).

O emprego de uma droga antidepressiva clinicamente eficaz (controle ativo) é importante para verificar a validade da execução dos experimentos. Neste teste, foi utilizado a imipramina, fármaco comumente utilizado em testes clínicos na detecção de novas substâncias potencialmente antidepressivas, tal que estudos relatam que a imipramina na dose de 20 mg/kg foi efetiva em reverter a anedonia causada por estresse, como no estudo de Monleon e colaboradores (1995). A imipramina é um antidepressivo tricíclico que inibe a recaptação de noradrenalina e serotonina. Como citado anteriormente, algumas classes de antidepressivos inibem a óxido nítrico sintase (NOs), principalmente os inibidores da recaptação de serotonina. Estudos recentes demonstraram que a imipramina inibe a síntese de NO, resultando na diminuição dos níveis plasmáticos deste neurotransmissor, sendo este mecanismo importante na ação antidepressiva deste fármaco, uma vez que a administração prévia de L-arginina (um inibidor da NOs) foi capaz de potencializar este efeito antidepressivo (Harkin, *et al.* 1999; Krass, *et al.* 2011). Em relação à neurogênese hipocampal, trabalhos relatam que a imipramina induz a expressão de BDNF, revertendo os níveis desta neurotrofina após a indução da depressão (Takano, *et al.* 2012; Réus, *et al.* 2013; Bessa, *et al.* 2013).

A miricitrina é um flavonóide, do subgrupo flavonol, extraído de várias plantas do gênero *Pouteria*, como por exemplo, da *Manilkara zapota* e da *Eugenia uniflora* (popularmente conhecida como pitangueira) (Ma, *et.al.*, 2003, 2004). As principais atividades deste flavonóide são relacionadas a efeitos antioxidantes, antinociceptivo, antiinflamatórios e antioncogênicos (Birt, *et.al.*, 2001; Edenharder e Grünhage, 2003; Meotti, *et.al.*, 2006, 2008; Middleton, *et.al.*, 2000); por outro lado, a ação deste flavonóide no SNC somente é remetida a uma possível atividade ansiolítica e antipsicótica (Fernandez *et.al.*, 2009; Pereira, 2011). Dentro dos mecanismos de ação estabelecidos para este flavonóide, foram demonstradas sua capacidade de atuação sobre o NO, nNOS, PKC, PI3-K e NFkB (Meotti, *et.al.*, 2006; Agullo, *et.al.*, 1997; Gamet-Payrastre, *et.al.*, 1999). Em relação a sua atividade sobre o NO, este se dá em relação a uma inibição da síntese deste, por atuar diretamente na cascata que leva a sua síntese ao modular a atividade da nNOs, tal que os efeitos antinociceptivo e antipsicótico da miricitrina são revertidos pela administração prévia de L-arginina (Meotti, *et al.* 2006; Pereira *et al.*, 2011), indicando uma possível

mediação nitrinérgica; portanto, baseado nas ações neuroquímicas da miricitrina, pode-se dizer que esta também possui um potencial efeito antidepressivo.

Como relatado na introdução do presente projeto, a miricitrina apresenta atividade inibitória sobre o NO, que por sua vez já foi relacionada à depressão. Assim sendo, a miricitrina se torna uma substância de possível potencial terapêutico a ser investigada para o tratamento deste transtorno psiquiátrico.

## 1. OBJETIVOS:

O presente trabalho tem por objetivo investigar os efeitos do flavonóide miricitrina em testes de comportamento tipo depressivo analisando algumas das possíveis alterações neuroquímicas e celulares associadas suas ações.

### *1.1. Objetivos gerais:*

- ◆ Avaliação do potencial efeito antidepressivo da miricitrina;
- ◆ Avaliação da participação do NO e do eixo HPA no mecanismo de ação da miricitrina.

### *1.2. Objetivos específicos:*

- ◆ Avaliar a ação tipo antidepressiva da miricitrina, utilizando os seguintes testes animais: comportamentos tipo depressivos induzidos por modelo de estresse brando; teste de preferência de sacarose; teste de nado forçado;
- ◆ Avaliar o efeito da miricitrina na atividade motora de animais submetidos ao teste do campo aberto;
- ◆ Avaliar o efeito do tratamento com a miricitrina no aumento do tamanho da glândula adrenal induzido por estresse brando e imprevisível.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS:

### 2.1. Animais:

Serão utilizados camundongos Swiss machos, pesando entre 30-40g, provenientes do biotério do Setor de Ciências Biológicas da UFPR, mantidos, individualmente, em caixas de propileno em condições controladas de temperatura ( $21 \pm 1^\circ\text{C}$ ), com ciclo claro-escuro de 12h (luzes ligadas às 7:00 h e desligadas às 19:00 h), com comida e água à vontade.

### 2.2. Drogas utilizadas:

- Miricitrina (10mg/kg): isolada do gênero *Eugenia* (fornecida pelo Prof. Dr. Moacir Geraldo Pizzolatti – UFSC, extraída com grau de pureza de 98%, testado por análise em HPLC), dissolvida em Tween 80 e salina, e administrada por via intraperitoneal (ip), em volume constante de 10 ml/kg de peso corporal.

- Imipramina (20mg/kg): empregada como controle positivo neste modelo de depressão, será dissolvida em água destilada e administrada por via ip, em volume constante de 10 ml/kg de peso corporal.

As doses propostas foram baseadas em estudos anteriores em nosso laboratório: imipramina (Skalisz et al. 2004) e estabelecimento de curva dose-resposta feita em nosso laboratório para a miricitrina (Pereira, *et al.* 2011).

### 2.3. Modelos comportamentais:

#### 2.3.1. Preferência por solução de sacarose:

Primeiramente, estabeleceu-se a melhor concentração de sacarose a ser utilizada nos testes subseqüentes; As doses utilizadas foram de 0,5% a 2,5% e a partir da curva de preferência dos animais, a melhor concentração de sacarose foi estabelecida. Esta análise foi realizada com a exposição do animal à solução de sacarose durante 24 horas, sendo que não houve privação de água e comida para a realização do teste. (Monleon *et al.*, 1995)



A preferência de sacarose é medida através da pesagem das garrafas de água e de sacarose antes do teste e após 24 horas, usando-se a diferença para o cálculo da preferência de sacarose, que é feita através da equação abaixo:

$$\% \text{ preferência de sacarose} = \frac{\text{consumo total de sacarose} \times 100}{\text{Consumo total (H}_2\text{O} + \text{sacarose)}}$$

O parâmetro utilizado foi o estabelecimento da curva de preferência dos animais, e a partir disto a melhor concentração foi estabelecida.

Para a divisão entre os grupos, os animais foram submetidos à duas exposições à sacarose e a partir do consumo da segunda exposição foi feito o pareamento dos animais, a partir da similaridade do consumo. Em seguida, os camundongos foram divididos entre grupo controle e grupo estresse de maneira randomizada. Posteriormente, os animais foram expostos a baterias de estresse brando repetido e a diminuição do consumo de sacarose foi tomada como indicativo de anedonia nos animais, sendo que as baterias e o teste de consumo de sacarose foram aplicados por 5 semanas consecutivas, tempo estabelecido para que os camundongos do grupo estresse adquirissem o comportamento anedônico.

#### 2.3.2. Anedonia induzida por estresse brando repetido e imprevisível:

Os camundongos foram divididos em dois grupos, estressados e não estressados, de acordo com os pares de animais estabelecidos pelo teste de preferência de sacarose (detalhado anteriormente).

As baterias de estresse foram iniciadas em horários diferentes do dia, para evitar que o animal se habituassem a um horário específico de manipulação e com isso não desenvolvessem a anedonia. Os animais foram expostos diariamente a diferentes tipos de estresse, sendo que cada semana a bateria era alterada para que o animal não se acostumassem com uma sequência de estressores. Os estresses a que os animais foram submetidos eram: caixa inclinada, exposição a claro constante (24h), exposição a escuro constante (24h), privação de água (máximo de 18h),

privação de comida (máximo de 18h) e cepilho úmido (24h) (Monleon *et al.* 1995; Willner, 2005). Sendo que estas baterias de estresse foram realizadas por 5 semanas consecutivas para indução de anedonia e mais duas semanas posteriores para reversão da anedonia pelo tratamento (imipramina ou miricitrina).

Após os animais apresentarem anedonia induzida por estresse brando e mensurada por teste de preferência de sacarose, eles foram submetidos ao teste de campo aberto e ao teste de nado forçado, para o estabelecimento basal desses parâmetros. Os animais foram tratados por 14 dias com as seguintes drogas: miricitrina (10 mg/kg), imipramina (20 mg/kg) e salina, sendo que durante este intervalo eles foram submetidos semanalmente aos testes de nado forçado e campo aberto para avaliar as alterações comportamentais ocorridas em decorrência do tratamento. (Monleon, et al. 1995; Willner, 2005).

#### 2.3.3. Teste do campo aberto:

Para analisar a atividade locomotora dos animais, usou-se o teste do campo aberto, um aparato experimental construído com piso de madeira e paredes de aço escovado com 35 cm de altura delimitando uma área circular de 50 cm de diâmetro sendo o assoalho pintado de branco, subdividido com linhas pretas traçadas através de dois círculos concêntricos com várias linhas radiais formando figuras semelhantes a trapézios.

Após a aplicação das drogas (imipramina, miricitrina ou salina) e posterior habituação dos camundongos à sala de experimentação por 30 minutos, cada camundongo foi colocado no centro da arena e seu comportamento quantificado durante 5 minutos. O intuito do teste foi analisar a locomoção do animal, verificando-se, desta forma, se os resultados obtidos em outros testes não eram decorrentes de alterações motoras nos animais em consequência do tratamento recebido. (Walsh e Cummins, 1976).

#### 2.3.4. Teste de natação forçada:

Após o teste do campo aberto, os animais foram colocados no centro de um cilindro de vidro (5 x 12,5 cm) preenchido com 19 cm de água a aproximadamente

24 ± 2 °C, durante o tempo de 6 minutos, sendo medido o tempo de imobilidade do animal nos últimos 4 minutos, em um regime minuto a minuto. O animal foi julgado imóvel quando parava de nadar e executava apenas movimentos mínimos apenas para permanecer flutuando com a cabeça acima do nível da água. Após o teste de cada camundongo, estes foram secos e colocados em ambiente aquecido, enquanto que a água do cilindro foi trocada ao término de cada teste. É considerado efeito antidepressivo uma redução do tempo de imobilidade em dose que não aumenta a atividade locomotora. (Porsolt, 1977 et. Al.; Borsini e Meli, 1988).

#### 2.3.5. Teste de suspensão pela cauda:

O protocolo de teste foi uma adaptação do trabalho de Steru e colaboradores (1985), executado apenas para a retirada e pesagem das glândulas adrenais. Um grupo diferente de animais foi submetido à indução da anedonia por estresse brando (esta mensurada pela preferência de sacarose), sendo que os camundongos estressados e seus controles não estressados passaram por 2 exposições ao teste de suspensão pela cauda, uma após a indução da anedonia e uma após 14 dias de tratamento com imipramina, miricitrina ou salina (tratamento realizado diariamente). Nos dias dos testes, os camundongos eram habituados à sala de teste por meia hora e em seguida, submetidos ao teste individualmente.

Neste teste é analisado o tempo total de imobilidade do animal, nos 4 últimos minutos, de um total de 6 minutos de teste. No teste, os camundongos são isolados em uma plataforma sendo suspensos pela cauda a uma altura de 50 cm do chão, utilizando para tanto uma fita adesiva colocada a aproximadamente 1 cm da ponta da cauda. É proposto que substâncias com atividade antidepressiva diminuem o tempo de imobilidade dos animais neste teste, sem alterar a sua atividade locomotora (Cryan *et al.* 2002).

#### 2.3.6. Pesagem da glândula adrenal:

Após o sacrifício dos animais submetidos ao modelo de anedonia induzida por estresse brando e repetido e submetidos à bateria de suspensão pela cauda, as glândulas adrenais foram retiradas e pesadas, sendo posteriormente calculado o peso relativo (peso órgão /peso animal).

#### 2.4. *Análise estatística:*

Os dados foram analisados por ANOVA de uma via (peso relativo da adrenal) ou duas vias (anedonia medida por consumo de sacarose, nado forçado, suspensão pela cauda e campo aberto), seguido do *post-hoc* de Tukey para comparações múltiplas ou teste t de Student (preferência de sacarose durante indução de anedonia por estresse brando e repetido). O nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ) foi considerado estatisticamente significativo em todos os dados analisados.

### 3. RESULTADOS:

#### 3.1. *Determinação da melhor concentração de sacarose:*

Para determinar a melhor concentração de sacarose, foi realizado um teste basal para a determinação da melhor concentração de sacarose a ser empregada nos testes subsequentes de anedonia induzida por estresse brando. Para este fim, 30 camundongos Swiss foram utilizados, aos quais foram oferecidas soluções de sacarose com diferentes concentrações, que variaram entre 0.5% a 3.0%. Estas soluções foram ofertadas por 24 horas, intercaladas por um dia. A partir disto, foi estabelecida a curva de preferência de sacarose, no qual um consumo entre 50% e 70% foi considerado a melhor concentração; portanto, a concentração de 1% foi escolhida, resultando em um grupo onde os 24 animais que tiveram o consumo de sacarose dentro destes parâmetros (Figura 1).

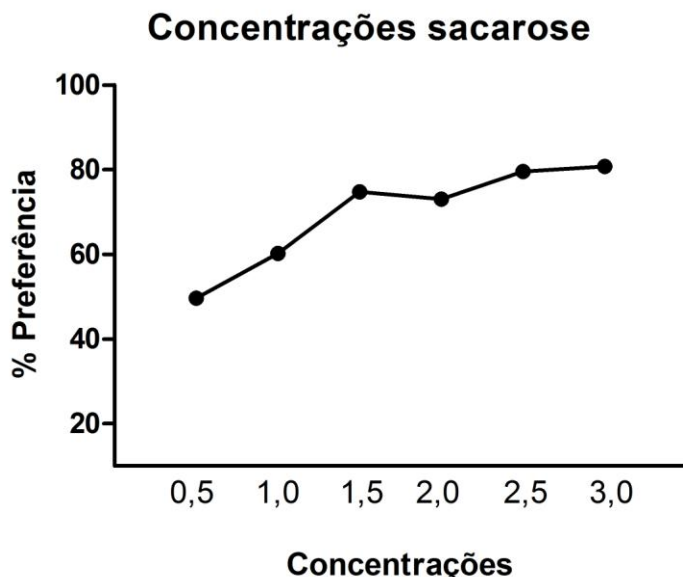


Figura 1 – Determinação da concentração ideal de sacarose para o plantel de camundongos da UFPR. Dados representam média $\pm$ SEM (n=26-28). Concentração ideal definida por consumo preferencial de sacarose de 50-70% dos animais, ou seja, 1%.

#### 3.2. *Análise da indução da anedonia por estresse brando mensurada pela preferência de sacarose:*

Os animais foram submetidos à cinco semanas de estresse brando repetido para indução da anedonia; A partir da preferência de sacarose basal os animais foram randomizados em grupo controle e grupo estresse e semanalmente foi realizado o teste de preferência de sacarose como parâmetro para análise da anedonia dos animais. É possível observar, através dos dados obtidos, que o estresse brando e repetido foi efetivo na indução do comportamento anedônico, uma vez que quatro semanas após a exposição o consumo de sacarose diminuiu significativamente no grupo estressado, enquanto que o grupo controle manteve uma média de consumo. Foi encontrada uma diferença estatisticamente significativa na quarta e quinta semana de tratamento, respectivamente: ( $t=3,78$ ;  $p<0,001$ ) e ( $t=5,75$ ;  $p<0,001$ ) (Figura 2).

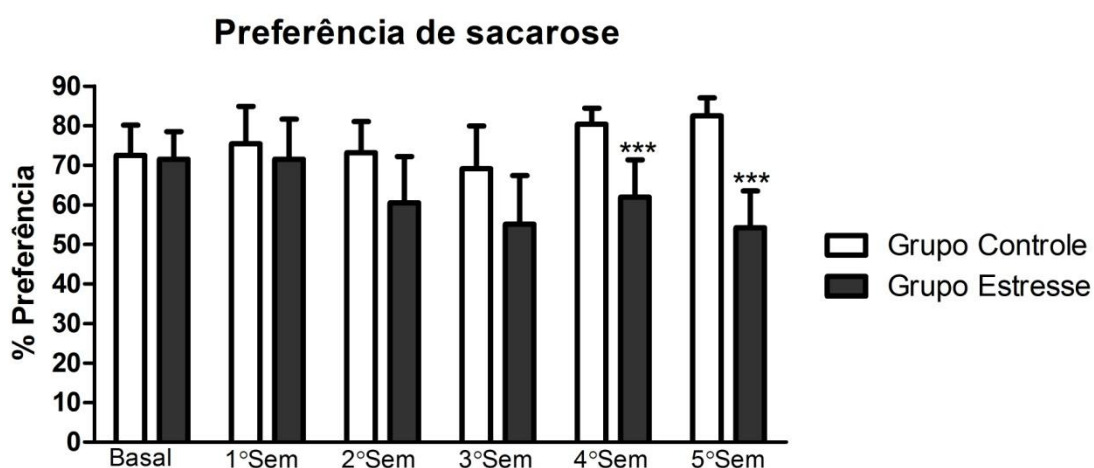


Figura 2 – Indução de anedonia por estresse brando e repetido. Avaliada por teste de consumo de sacarose (1%), duração de cinco semanas, com diferença estatisticamente significativa nas últimas duas semanas. Dados representam média $\pm$ SEM ( $n=17-18$ ). \*\*\* $P<0.001$  comparado com o grupo controle.

### 3.3. *Análise do efeito dos tratamentos no teste de preferência por solução de sacarose:*

Conforme previsto, pode-se observar que a imipramina foi efetiva em reverter o comportamento tipo depressivo, uma vez que aumentou a preferência por solução de sacarose dos animais com anedonia. É possível observar que a reversão foi significativa depois de 14 dias de tratamento. A miricitrina também obteve os mesmos resultados da imipramina, mostrando-se efetiva em reverter a anedonia induzida por estresse brando repetido e imprevisível após 14 dias de tratamento.

Sendo assim, não houve diferença entre os dois tratamentos. ANOVA de duas vias seguida de *post-hoc* de Tukey: fator tratamento ( $F_{5,29}=11,81$ ;  $p<0.001$ ); fator tempo ( $F_{2,58}=6,66$ ;  $p<0.002$ ); interação tempo X tratamento ( $F_{10,58}=7,23$ ;  $p<0.001$ ) (Figura 3).

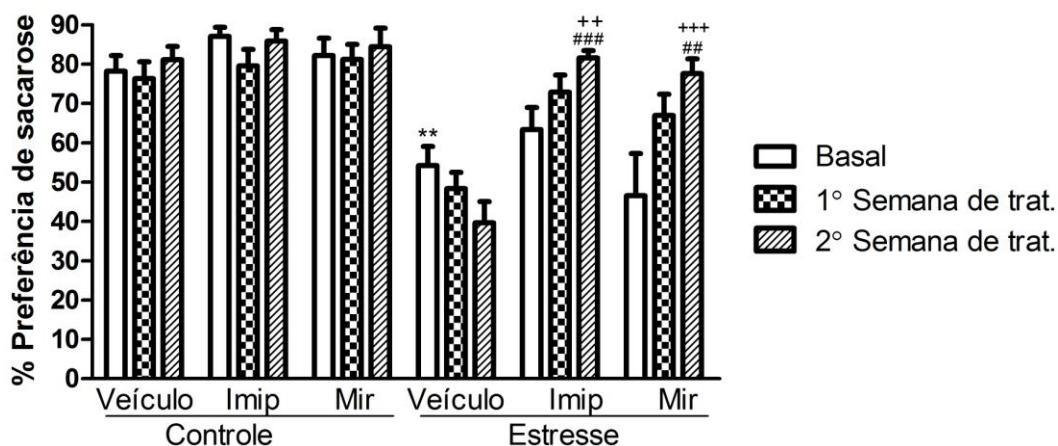


Figura 3 – Reversão da anedonia induzida por estresse brando e repetido após tratamento com imipramina (20.0 mg/kg) ou miricitrina (10.0 mg/kg) durante 15 dias. Dados representam média $\pm$ SEM (n=7-8). \*\* $P<0.01$ ; \*\*\* $P<0.001$  comparado com a medida basal. ## $P<0.01$  e ### $P<0.001$  comparado com o mesmo tratamento na semana anterior. ++ $P<0,01$  e +++ $P<0.001$  comparado ao estresse tratado com salina.

### 3.4. Análise do efeito dos tratamentos no teste do campo aberto:

Nesta etapa, o objetivo foi averiguar uma possível alteração motora decorrente dos tratamentos, o que poderia produzir falsos resultados nos testes de depressão. Os camundongos foram submetidos ao teste do campo aberto em três momentos distintos: a primeira exposição foi na quinta semana de exposição ao estresse brando, a seguinte após a primeira semana de tratamento e a última, após a segunda semana de tratamento (cada exposição durou 5 minutos). Os dados obtidos demonstram que nenhum tratamento diferiu significativamente do grupo controle, tanto na primeira como na segunda semana, no qual pode-se constatar que as drogas aplicadas não prejudicaram a atividade locomotora do animal, mostrando ainda que a anedonia e a imobilidade do nado forçado não foram influenciados por alteração da atividade motora. ANOVA de duas vias seguida de *post-hoc* de Tukey: fator tratamento ( $F_{5,29}=1,34$ ;  $p<0,27$ ); fator tempo ( $F_{2,58}=9,21$ ;  $p<0.001$ ); interação tempo X tratamento ( $F_{10,58}=0,95$ ;  $p<0.49$ ) (Figura 4).

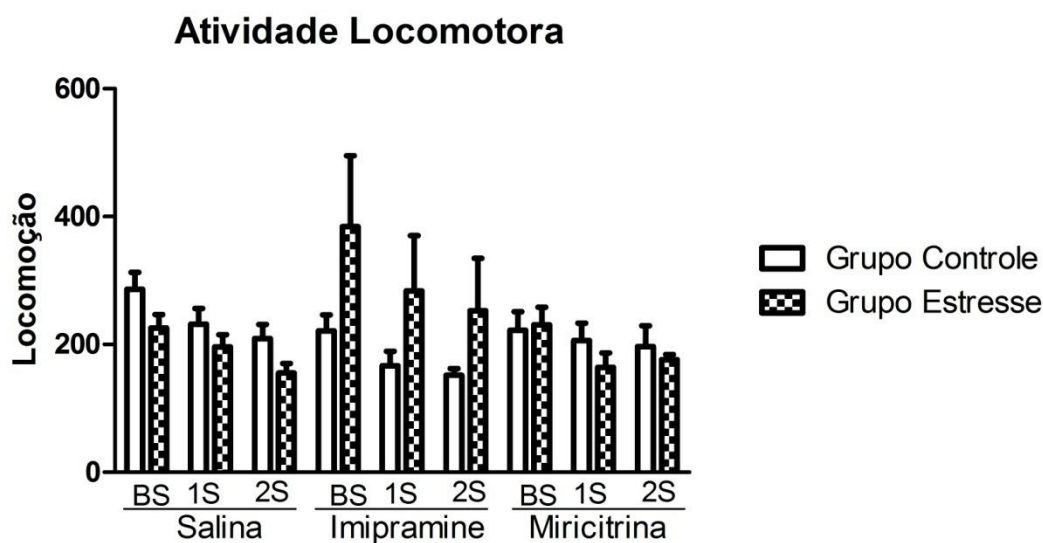


Figura 4 – Análise da atividade locomotora no campo aberto de camundongos submetidos ao modelo de estresse brando e repetido tratados com imipramina (20.0 mg/kg) ou miricitrina (10.0 mg/kg) durante 15 dias. Medida dada por número de quadrantes cruzados. Dados representam média $\pm$ SEM (n=5-6)(BS: basal; 1S: primeira semana de tratamento; 2S: segunda semana de tratamento).

### 3.5. Análise do efeito dos tratamentos no teste do nado forçado:

Após 5 semanas de estresse brando repetido (tempo necessário para a indução da anedonia), os animais foram submetidos a um teste basal de nado forçado. Neste modelo experimental o tempo de imobilidade dos animais foi tomado como medida como comportamento tipo depressivo; vale ressaltar que os animais utilizados neste teste são os mesmos em que foi observada a reversão do comportamento anedônico com o tratamento com a imipramina (controle positivo) e a miricitrina (droga teste). Como esperado, a imipramina diminuiu o tempo de imobilidade no teste do nado forçado; a miricitrina obteve o mesmo efeito, sendo que não houve diferença em ambas as drogas, tanto ao longo do tratamento, assim como na eficácia na reversão do alto tempo de imobilidade. A diminuição do tempo de imobilidade no teste do nado forçado foi significativa já após 7 dias de tratamento, sendo que os resultados continuaram significantes após os 14 dias de tratamento. ANOVA de duas vias seguida de *post-hoc* de Tukey: fator tratamento ( $F_{5,29}=34,32$ ;  $p<0.001$ ); fator tempo ( $F_{2,58}=9,21$ ;  $p<0.001$ ); interação tempo X tratamento ( $F_{10,58}=7,46$ ;  $p<0.001$ ) (Figura 5).



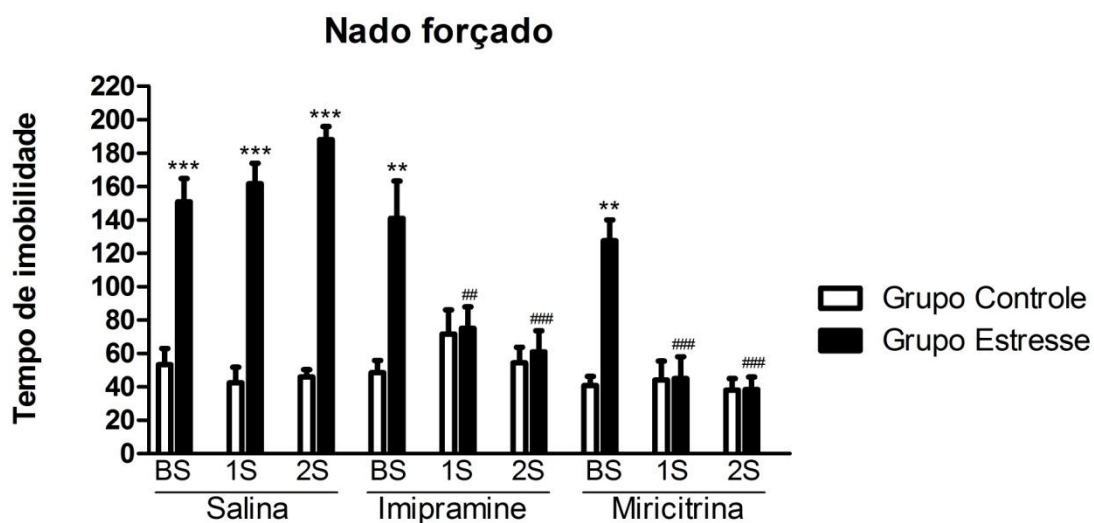


Figura 5 – Análise do tempo de imobilidade (mensurada em segundos) dos animais no teste de nado forçado em camundongos submetidos ao estresse brando repetido antes e após o tratamento dos animais com imipramina (20.0 mg/kg) ou miricitrina (10.0 mg/kg) durante 15 dias. O BS (basal) corresponde à avaliação pré-tratamento com imipramina, miricitrina ou salina. Dados representam média±SEM (n=5-6). \*\*P<0.01; \*\*\*P<0.001 comparado com o grupo controle. ##P<0.01; ###P<0.001 comparado com a medida basal do mesmo tratamento.

### 3.6. Análise do efeito dos tratamentos no teste de suspensão pela cauda:

Após a indução da anedonia em um grupo diferente de camundongos (dados não mostrados), estes foram submetidos a um teste basal de suspensão pela cauda. O tempo de imobilidade foi significativamente maior no grupo com anedonia (estressado) quando comparado ao grupo controle. Posteriormente, estes animais foram tratados pelo mesmo período de 14 dias com a imipramina (20mg/kg), miricitrina (10mg/kg) ou salina e reexpostos ao mesmo teste. Os dados obtidos demonstraram que tanto a imipramina quanto a miricitrina foram efetivas em reverter o comportamento anedônico no teste de suspensão pela cauda. ANOVA de duas vias seguida de *post-hoc* de Tukey: fator tratamento ( $F_{5,36}=62,07$ ;  $p<0.001$ ); fator tempo ( $F_{1,36}=37,61$ ;  $p<0.001$ ); interação tempo X tratamento ( $F_{5,36}=14,99$ ;  $p<0.001$ )(Figura 6).

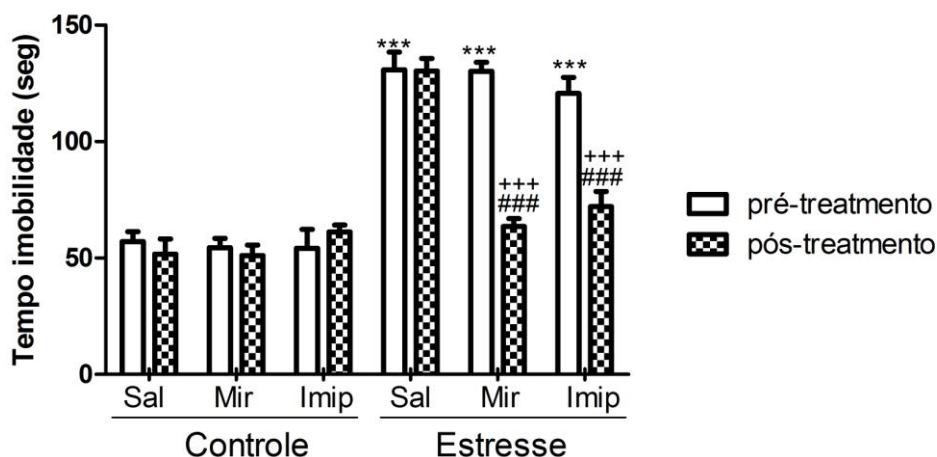


Fig.6: Análise do tempo de imobilidade no teste de suspensão pela cauda de camundongos submetidos ao modelo de estresse brando e repetido antes e após o tratamento dos animais com imipramina (20mg/kg) ou miricitrina (10mg/kg). Dados representam média $\pm$ SEM (n=7). Medida dada em segundos de imobilidade. \*\*\*p<0.001-comparado ao grupo controle; ###p<0.001 - comparado ao pré-tratamento; +++p<0.001 - comparado ao grupo estresse tratado com salina.

### 3.7. Pesagem da glândula adrenal de camundongos submetidos a estresse brando repetido e imprevisível:

Após o teste de suspensão pela cauda, os animais foram sacrificados e suas glândulas adrenais retiradas para quantificação de seu peso. O aumento do tamanho da glândula está relacionado à exposição a longos períodos de estresse e hiperatividade do eixo HPA. De acordo com o esperado, foi observada uma diferença significativa entre diferentes tratamentos dentro do grupo estresse, ou seja, o grupo estresse salina apresentou um aumento do peso relativo da glândula em relação ao grupo salina não estressado, sendo que o tratamento com imipramina e miricitrina foi eficaz em reverter tal parâmetro. ANOVA de uma via seguida de *post-hoc* de Tukey: fator tratamento ( $F_{5,36}=14,81$ ;  $p<0.001$ )(Figura 7).

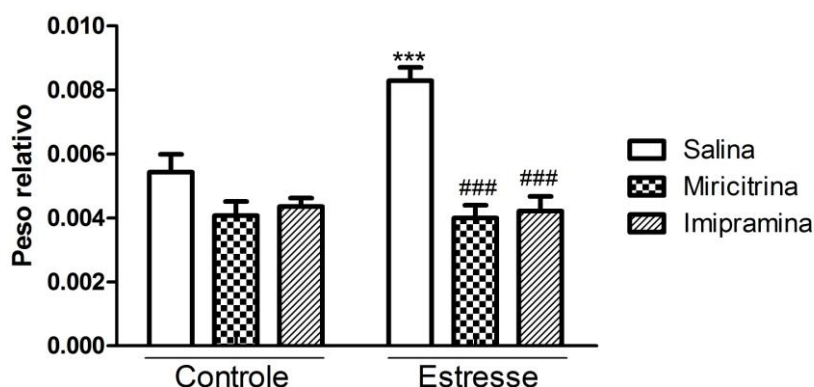


Figura 7: Peso relativo da adrenal (proporção do peso em relação ao peso do corpo) anedônicos após o tratamento com salina, imipramina (20mg/kg) ou miricitrina (10mg/kg). Dados representam média $\pm$ SEM (n=5-7) (\*\*p<0.001-comparado ao controle salina; ###p<0.001 - comparado ao grupo estresse tratado com salina).

#### 4. DISCUSSÃO:

Como previsto, foi possível observar que a aplicação do protocolo de estresse brando repetido e imprevisível induz um comportamento tipo anedônico, pois o consumo de sacarose dos camundongos do grupo estresse diminuiu significativamente nas duas últimas semanas do tratamento, indicando o comportamento tipo depressivo dos animais. Além disto, este protocolo também acarretou um aumento do tempo de imobilidade no teste de natação forçada. Como esperado, a imipramina reverteu esse comportamento tipo depressivo, pois diminuiu o tempo de imobilidade no teste do nado forçado, assim como aumentou a preferência de sacarose dos animais do grupo estresse após o tratamento. A miricitrina apresentou os mesmos resultados, uma vez que não houve diferença em relação à imipramina, podendo-se concluir que ambas foram igualmente efetivas em reverter o comportamento tipo depressivo dos animais. Já no teste do campo aberto, nenhum tratamento diferiu significativamente do grupo controle, indicando que as drogas utilizadas não causaram prejuízo na atividade locomotora dos animais; assim sendo, o aumento da imobilidade induzida pelo estresse brando não foi decorrente da incapacidade locomotora do animal. Os resultados com a imipramina indicam validade dos procedimentos realizados, indicando também um potencial efeito antidepressivo da miricitrina, uma vez que esta substância apresentou o mesmo perfil da imipramina.

Primeiramente, foi necessária a determinação da concentração ideal de sacarose, ou seja, onde a maior porção dos animais apresentará um consumo de sacarose maior em relação ao consumo de água. Este consumo parece seguir uma função que se apresenta como curva em U invertida, sendo a curva a concentração ideal; além deste ponto, o consumo tende a cair (Monleon *et al.* 1995). Além disto, procurou-se determinar a concentração limiar que não obtivesse um valor hedônico elevado, de modo que o efeito deletério decorrente dos estresses repetidos não fosse diminuído. No presente estudo, a concentração ideal foi de 1%.

O teste da anedonia induzida por estresse brando repetido e imprevisível é um modelo amplamente utilizado e aceito como indutor de comportamento tipo depressivo nos animais, tal que apresenta uma boa validade de face, de constructo e preditiva, sendo, entretanto, um procedimento de execução longa (Willner 1997;

Joels *et al.* 2004). Ao se adotar este protocolo, parâmetros como o aumento de nNOS e dos níveis de corticosterona (e consequentemente, da glândula adrenal) são bem observados, assim como a anedonia (característica fundamental de todas as formas de depressão), que consiste na perda de interesse nas atividades que antes eram prazerosas, no caso dos camundongos, perda da preferência por solução de sacarose (Tsigos e Chrousos, 2002; Willner, 2005; Mössner *et al.* 2007; Zhou, 2007; Yazir, *et al.* 2012). É interessante citar que há uma demora na indução da anedonia, bem como a necessidade de tratamento repetido para sua reversão; portanto, não só os sinais e sintomas observados em pacientes depressivos são mimetizados, mas também a cronologia da doença, uma vez que este não desenvolve-se rapidamente e o tratamento leva semanas para começar a apresentar efeitos clínicos (Willner, 1997). Os dados obtidos demonstram que os animais expostos a diferentes estressores levaram cinco semanas para apresentar comportamento tipo anedônico, quando comparados ao controle; entretanto, o protocolo inicial proposto por Willner e colaboradores (1997) cita que apenas duas semanas foram efetivas em induzir a anedonia. Tal diferença é decorrente tanto dos animais utilizados, pois no presente estudo utilizamos camundongos e não ratos, assim como ocorreu uma modificação da sequência de estressores em relação à sequência original. Já o tempo de redução do consumo de sacarose no presente trabalho, de duas semanas, também foi observado por Ma e colaboradores (2011) e Azpiroz e colaboradores (1999) – este também adotou a imipramina na reversão da anedonia. Enfim, nosso protocolo foi eficaz na indução da anedonia, além de que tempos diferentes de exposição aos estressores para indução deste comportamento foram relatados por outros estudos (até nove semanas); este é um indicativo que o tempo necessário para se obter animais anedônicos é dependente da linhagem destes (Mineur, *et al.* 2006; Li *et al.* 2008; Schweizer *et al.* 2009).

A imipramina, droga padrão utilizada para a reversão da anedonia, foi utilizada na dose de 20 mg/kg, como no estudo de Monleon e colaboradores (1995), que relata sua efetividade em reverter a anedonia causada nos camundongos por estresse. A ação deste fármaco ocorre através da inibição da recaptação de serotonina e norepinefrina, sendo que o óxido nítrico está envolvido na ação desta droga, já que foi reportado que esses neurotransmissores são modulados pelo NO; além disso, o estudo de Kumar e colaboradores (2009) demonstrou o envolvimento

do sistema nitrinérgico em alguns efeitos da imipramina, através da administração prévia de L-arginina (precursor do NO), resultando na reversão dos efeitos da imipramina em testes de ansiedade. A miricitrina, como visto anteriormente, também atua sobre o sistema nitrinérgico, através da inibição sobre a nNOs. Esta ação foi descrita primeiramente por Meotti e colaboradores (2006), pois seu efeito antinociceptivo foi atenuado pela administração prévia de L-arginina; o mesmo ocorreu na ação antipsicótica da miricitrina (Pereira, *et al.* 2011).

O teste de campo aberto é bem validado, sendo que tem sido utilizado como indicativo da atividade motora do animal. A ambulação neste projeto foi avaliada para verificar se o tempo de imobilidade no nado forçado era decorrente de alterações na locomoção do animal causadas pela dose dos tratamentos aplicados, e como não houve diferença de locomoção entre o grupo estresse e o grupo controle, pôde-se constatar que as doses utilizadas em ambas as drogas não prejudicam a atividade locomotora (Walsh, 1976; Monleon, *et al.* 1995; Pereira, *et al.* 2011).

O teste de natação forçada foi descrito por Porsolt e colaboradores em 1977 primeiramente em ratos, e subsequentemente, em camundongos. Este modelo é de rápida execução (boa replicabilidade) e de boa validade preditiva, sendo por isto amplamente utilizado para detectar o potencial efeito antidepressivo de novas drogas (Porsolt *et al.* 1978; Borsini e Meli, 1988; Demouliere *et al.* 2005). Esse teste consiste em analisar o tempo de imobilidade dos animais (Porsolt, *et al.*, 1977), pois sua premissa é a de que em uma situação de estresse inescapável, ratos e camundongos adquirem uma postura de imobilidade, esta reduzida por fármacos antidepressivos. O comportamento normal de um animal é, após movimentos iniciais vigorosos para a fuga dirigida para fora do cilindro de água, a alternância de imobilidade (ou de movimentos mínimos apenas para manter a cabeça fora da água) e movimentos de fuga (natação e escalada das paredes laterais), sendo que drogas antidepressivas reduzem o tempo de imobilidade. Um aumento do tempo de imobilidade, como o observado nos animais do grupo estressado, indicaria um comportamento tipo depressivo; este fator pode ser correlacionado com o transtorno em humanos, pois pacientes depressivos tendem a repetir os comportamentos, ou seja, não possuem maior capacidade de mudar de estratégias como os indivíduos que não sofrem desta doença. Este comportamento pode ser observado nos animais

submetidos ao teste – aqueles que possuem um maior tempo de imobilidade, conseqüentemente, diminuíram a alternância entre os dois comportamentos (fuga ou imobilidade) em relação ao grupo controle (Thierry, *et al.* 1984). Diversos estudos reportam que fármacos antidepressivos aumentam o período de atividade dos animais e, conseqüentemente, diminuem a imobilidade (Borsini e Meli, 1988; Demouliere *et al.* 2005). Os camundongos deste estudo foram submetidos a três baterias de teste de nado forçado, sendo a primeira para determinar o tempo de imobilidade basal após a indução da anedonia, enquanto que as duas restantes foram realizadas após o tratamento (7 e 14 dias de tratamento, respectivamente) – a imipramina e a miricitrina foram igualmente efetivas em diminuir significativamente este tempo de imobilidade, pois as tentativas de fuga aumentaram, indicando que o comportamento tipo depressivo foi revertido após o tratamento. Segundo Mezaadri e Batista (2011), a exposição repetida ao teste poderia causar a habituação dos animais, levando ao aumento do tempo de imobilidade, fato que não foi observado no presente estudo. O principal fator está relacionado ao uso de camundongos ao invés de ratos, pois o protocolo com estes últimos compreende uma pré-exposição de 15 minutos ao nado forçado e testes subsequentes de 5 minutos, tal que o protocolo de camundongos consiste em sessões de nado com duração de 6 minutos, sem pré-exposição; os primeiros 2 minutos de nado não são avaliados, pois como citado anteriormente, inicialmente os animais nadam vigorosamente na tentativa de fuga.

Estudos têm demonstrado que animais submetidos ao protocolo de estresse crônico apresentam hipertrofia da adrenal, e que o tratamento com inibidores da monoamino oxidase (MAOi) diminuiu o tamanho significativamente após tratamento crônico (Reul, *et al.* 1993; Reul, *et al.* 1994). Além disto, a resposta dos animais ao estresse de exposições repetidas ao nado forçado é dependente da serotonina, sendo esta modulada pelos níveis de CRF. Portanto, quando o animal é re-exposto ao teste, a serotonina disponível na fenda sináptica é diminuída devido à modulação exercida pelo aumento do CRF, resultando na imobilidade; os níveis de serotonina são re-estabelecidos após a inibição de CRF, diminuindo a imobilidade do animal em exposições repetidas ao teste do nado forçado. Sendo assim, um aumento no tamanho da adrenal após estresse repetido pode ser considerado um indicativo da hiperatividade do eixo HPA (Price, *et al.* 2002). Os dados obtidos no presente estudo

mostraram uma hipertrofia da glândula adrenal nos animais estressados, esta revertida após tratamento com imipramina e miricitrina, indicando uma reversão dos efeitos do estresse repetido no eixo HPA; ambas as drogas, ou seja, a imipramina (antidepressivo padrão) e a miricitrina apresentaram um perfil similar nesta ação.

O teste da suspensão pela cauda é outro modelo comportamental de depressão que também possui boa validade preditiva (Steru, *et al.* 1985; Cryan, *et al.* 2002), e assim como no nado forçado, o camundongo é colocado em uma situação de estresse inescapável, neste caso a suspensão pela cauda a uma altura de 50 cm do chão, adotando uma postura imóvel. O esperado é que os animais tratados com antidepressivos comecem a fazer movimentos de escape (ou seja, seu tempo de imobilidade é menor), no qual o aumento desta atividade é fortemente correlacionado com efeitos antidepressivos em humanos (Cryan, *et al.* 2005). Estudos têm reportado que fármacos antidepressivos como a imipramina são efetivos em diminuir o tempo de imobilidade (Ripoll, *et al.* 2003; Varty, *et al.* 2003). Os movimentos analisados são praticamente os mesmos do nado forçado: imobilidade (quando o animal está parado), “swinging”, (o animal se balança de um lado para o outro, equivale à natação no NF) e o “curling”, (o animal encurva seu corpo para cima, equivale à escalada). Nosso protocolo experimental dos testes de natação forçada e suspensão pela cauda foram executados após a indução da anedonia, antes e após tratamento farmacológico, sendo possível observar o comportamento de imobilidade do animal em fase anedônica e verificar sua sensibilidade aos tratamentos. Assim como nos estudos de Cryan e colaboradores (2005) e Borsini e Meli (1988), a imipramina mostrou-se eficaz na reversão da imobilidade nos testes de nado forçado e de suspensão pela cauda. A miricitrina também foi efetiva em reverter a imobilidade no teste de nado forçado em ambos os testes, sem alterar a atividade motora inata dos animais; sendo assim, a miricitrina apresentou um efeito tipo antidepressivo, tornando-se um interessante potencial para o desenvolvimento de fármacos com atividade antidepressiva.



## **5. CONCLUSÃO:**

O objetivo do presente estudo foi avaliar o potencial efeito antidepressivo da miricitrina através da administração crônica nos animais com anedonia induzida pelo protocolo de estresse brando repetido e imprevisível, mensurada pela preferência por solução de sacarose, teste de natação forçada, suspensão pela cauda e pesagem da glândula adrenal. Neste sentido, observou-se que a miricitrina reverteu o comportamento anedônico e a diminuição do tempo de imobilidade tanto no nado forçado, quanto na suspensão pela cauda; a hipertrofia da adrenal também foi revertida nos animais tratados. A imipramina, droga antidepressiva padrão, apresentou os mesmos resultados, sem diferença entre ambas. Portanto, pode-se concluir que os dados obtidos neste trabalho suportam a hipótese de que a miricitrina apresenta um potencial efeito antidepressivo, em doses que não prejudicam a atividade locomotora.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- Aguilera, G. *et.al.* Negative regulation of corticotropin releasing factor expression and limitation of stress response. **Stress**. v. 10, p. 153-161. 2007.
- Agullo, G. *et al.* Relationship between flavonoid structure and inhibition of phosphatidylinositol-3 kinase: a comparison with tyrosine kinase and protein kinase C inhibition. **Biochem Pharmacol**. v. 53, p. 1649-1657. 1997.
- Anand, A., Charney, D.S. Norepinephrine dysfunction in synapse in depression. **J. Clin. Psychiatry**. v. 61, p. 16-24. 2000.
- Azpiroz, A. *et.al.* Effects of chronic mild stress (CMS) and imipramine administration, on spleen mononuclear cell proliferative response, serum corticosterone level and brain norepinephrine content in male mice. **Psychoneuroendocrinology**. v. 24, n. 3, p. 345-361. 1999.
- Balu, D. *et al.* Differential regulation of central BDNF protein levels by antidepressant and nonantidepressant drug treatments. **Brain Research**. v. 1211, p. 37-43. 2008.
- Bessa, J. M. *et al.* Stress-induced anhedonia is associated with hypertrophy of medium spiny neurons of the nucleus accumbens. **Translational Psych**. v. 3, p. 1-7. 2013.
- Berton, O.; Nestler, E. J. New approaches to antidepressant drug discovery: beyond monoamines. **Nat Rev Neurosci**. v. 7, n. 2, p. 137-151. 2006.
- Berntson, G. G.; Sarter, M.; Cacioppo, J. T. Ascending visceral regulation of cortical affective information processing. **Eur J Neurosci**. v. 18, n. 8, p. 2103-2109. 2003.
- Bettio, L. E. B. *et al.* Guanosine produces an antidepressant-like effect through the modulation of NMDA receptors, nitric oxide–cGMP and PI3K/mTOR pathways. **Behav Brain Res**. v. 234, p. 137-148. 2012.
- Birt, D. F.; Hendrich, S.; Wang, W. Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids. **Pharmacol Ther**. v. 90, p. 157–177. 2001.
- Bonhomme, N., Esposito, E. Involvement of serotonin and dopamine the mechanism of antidepressant drugs - review. **J. Clin. Psychopharmacol**. v. 18, p. 447-454. 1998.
- Borsini, F.; Meli, A. Is the forced swimming test a suitable model for revealing antidepressant activity? **Psychopharmacol. (Berl)**. Vol. 94, n. 2, p. 147-160. 1988.
- Bueno, B. G.; Caso, J. R.; Leza, J. C. Stress as a neuroinflammatory condition in brain: damaging and protective mechanisms. **Neurosci and Behav Rev**. v. 32, p. 1136-1151. 2008.

Casarotto, P. C.; Andreatini, R. Repeated paroxetine treatment reverses anhedonia induced in rats by chronic mild stress or dexamethasone. **Eur Neuropsychopharmacol.** v. 11, p. 735-742. 2007.

Ceylan, N. Ö. et al. Alterations in nitric oxide plasma level and arginase activity during the treatment of bipolar depressive episode. **Journal of Mood Disorders.** v.1, p. 1-6. 2011.

Cryan, J. F.; Markou, A.; Lucki, I. Assessing antidepressant activity in rodents: recent development and future needs. **Pharmacological Sciences.** v. 23, n. 5, p. 238-245. 2002.

Cryan, J. F.; Mombereau, C.; Vassout, A. The tail suspension test as a model for assessing antidepressant activity: review of pharmacological and genetic studies in mice. **Neurosci and Behav Rev.** n. 29, p. 571-625. 2005.

Demouliere, B. P.; Chenu, F.; Bourin, M. Forced swimming test in mice: a review of antidepressant activity. **Psychopharmacol.** n. 177, p. 245-255. 2005.

Dhir, A.; Kulkarni, S. K. Nitric oxide and major depression. **Nitric Oxide Rev.** v. 24, p. 125-131. 2011.

Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders. 4th ed. **American Psychiatric Association.** Washington (DC), 1994.

Eby, G. A.; Eby, K. L. Rapid recovery from major depression using magnesium treatment. **Med Hypotheses.** v. 67, p. 362-370. 2006.

Edenharder, R.; Grünhage, D. Free radical scavenging abilities of flavonoids as mechanism of protection against mutagenicity induced by tert-butyl hydroperoxide or cumene hydroperoxide in *Salmonella typhimurium* TA102. **Mutat. Res.** v. 540, p. 1-18. 2003.

Esplugues, J. V. NO as a signaling molecule in the nervous system. **Br J Pharmacol.** v. 135, p. 1079-1095. 2002.

Fernandez, S. P. et al. The flavonoid glycosides, myricitrin, gossypin and narigin exert anxiolytic action in mice. **Neurochem Res.** v. 34, n. 10, p. 1867-1875. 2009.

Finan, P. H.; Smith, M. T. The comorbidity of insomnia, chronic pain, and depression: Dopamine as a putative mechanism. **Sleep Medicine Rev.** v. 30, p. 1-11. 2012.

Fossier, P. et al. Nitric oxide transforms serotonin an inactive form and this affects neuromodulation. **Neuroscience.** v. 93, n. 2, p. 597-603. 1999.

Fries, G. R.; Magalhães, P. V. S. Basic research in Revista de Psiquiatria do Rio Grande do Sul. **Rev Psiquiatr Rio Gd Sul.** v. 32, n. 2, p. 33-34. 2010.

Gally, J. A. et al. The NO hypothesis: possible effects of a short-lived, rapidly diffusible signal in the development and function of the nervous system. **Proc Natl Acad Sci USA.** v. 87, p. 3547-3551. 1990.

Gamet-Payrastre, L. et al. Flavonoids and the inhibition of PKC and PI 3-kinase. **Gen. Pharmacol.** v. 32, p. 279-286. 1999.

Glowinski, J.; Axelrod, J. Inhibition of uptake of tritiated-noradrenaline in the intact rat brain by imipramina and structurally related compounds. **Nature**. v. 204, p. 1318-1319. 1964.

Gronli, J. *et al.* Chronic mild stress inhibits BDNF protein expression and CREB activation in the dentate gyrus but not in the hippocampus proper. **Pharmacol Biochem Behav**. v. 85, p. 842-849. 2006.

Gronli, J. *et al.* Extracellular levels of serotonin and GABA in the hippocampus after chronic mild stress in rats. A microdialysis study in an animal model of depression. **Behav Brain Res**. v. 181, p. 42-51. 2007.

Harkin, A. J. *et al.* Nitric oxide synthase inhibitors have antidepressant-like properties in mice. 1. Acute treatments are active in the forced swim test. **Eur J Pharmacol**. v. 372, p. 207-213. 1999.

Harkin, A. *et al.* Serotonergic mediation of the antidepressant-like effects of nitric oxide synthase inhibitors. **Neuropharmacology**. v. 44, p. 616-623. 2003.

Henn, F. A.; Vollmayr, B. Neurogenesis and depression: etiology or epiphenomenon? **Biol. Psychiatry**. v. 56, p. 146-150. 2004.

Hirschfeld, R.M. History and evolution of the monoamine hypothesis of depression. **J. Clin. Psychiatry**. v. 61, n. 6, p. 4-6. 2000.

Jesse, C. R. *et al.* Involvement of L-arginine – nitric oxide – cyclic guanosine monophosphate pathway in the antidepressant-like effect of tramadol in the rat forced swimming test. **Progress in Neuro-Psichopharmacol & Biological Psychiatry**. v. 32, p. 1838-1843. 2008.

Joels, M. *et al.* Effects of chronic stress on structure and cell function in rat hippocampus and hypothalamus. **Stress**. v. 7, p. 221-231. 2004.

Juruena, M. F.; Cleare, A. J.; Pariante, M. C. O eixo hipotálamo-pituitária-adrenal, a função dos receptores de glicocorticóides e sua importância na depressão. **Rev Bras Psiquiatr**. v. 26, n. 3, p. 189-201. 2004.

Kandel, E. R.; Schwartz, J. H.; Jessell, T. M. Disorders of mood: Depression, mania and anxiety disorders. **Principles of neural science**. New York. v. 4, p. 1209-1255. 2000.

Kiechele, F. L.; Malinski, T. Nitric oxide: biochemistry, pathophysiology, and detection. **Am J Clin Pathol.**; v. 100, p. 567-575. 1993.

Krass, M. *et al.* The antidepressant action of imipramine and venlafaxine involves suppression of nitric oxide synthesis. **Behav Brain Res**. v. 218, p. 57-63. 2011.

Krishnan, V.; Nestler, E. J. The molecular neurobiology of depression. **Nature**. v. 455, p. 894-902. 2008.

- Kubera, M. *et.al.* Prolonged desipramine treatment increases the production of interleukin-10, an anti-inflammatory cytokine, in C57BL/6 mice subject to the chronic mild stress model of depression. **J Affec Disord.** v. 63, p. 171-178. 2001.
- Kuhn, D. M.; Arthur, R. E. J. Inactivation of brain tryptophan hydroxylase by nitric oxide. **J Neurochem.** v. 67, p. 1072-1077. 1996.
- Lee, B. H. *et al.* Increased plasma nitric oxide metabolites in suicide attempters. **Neuropsychobiol.** v. 53, p. 127-132. 2006.
- Li, Y. *et.al.* TrkB regulates hippocampal neurogenesis and governs sensitivity to antidepressive treatment. **Neuron.** v. 59, p. 399-412. 2008.
- Ma, J. *et al.* Bioactive novel polyphenols from the fruit of *Manilkara zapota* (Sapodilla). **J Nat Prod.** v. 66, p. 983-986. 2003.
- Ma, J. *et al.* Analysis of polyphenolic antioxidants from the fruits of three *Pouteria* species by selected ion monitoring liquid chromatography-mass spectrometry. **J Agric Food Chem.** v. 52, p. 5873-5878. 2004.
- Ma, X. *et.al.* Social Isolation-Induced Aggression Potentiates Anxiety and Depressive-Like Behavior in Male Mice Subjected to Unpredictable Chronic Mild Stress. **PLoS One.** v. 6, n. 6, e. 20955. 2011.
- Machado, D. G. *et al.* Antidepressant-like effect of the extract of *Rosmarinus officinalis* in mice: Involvement of the monoaminergic system. **Progress in Neuro-Psychopharmacol & Biological Psychiatry.** v. 33, p. 642-650. 2009.
- Maier, S. F.; Watkins, L. R. Cytokines for psychologists: implications of bidirectional immune-to-brain communication for understanding behavior, mood, and cognition. **Psychol. Rev.** v. 105, n. 1, p. 83-107. 1998.
- Mattson, M. P.; Maudsley, S.; Martin, B. BDNF and 5-HT: a dynamic duo in age-related neuronal plasticity and neurodegenerative disorders. **Trends in Neurosc.** v. 27, n. 10, p. 589-594. 2004.
- McArthur, R.; Borsini, F. Animal models of depression in drug discovery. **Pharmacol Biochemistry and Behav.** v. 84, p. 436-452. 2006.
- McKinney, W. T.; Bunney, W. E. Animal model of depression. I. Review of evidence: implications for research. **Arch Gen Psychiatry.** v. 21, p. 240-248. 1969.
- Meotti, F. C. *et al.* Analysis of the antinociceptive effect of the flavonoid myricitrin: evidence for a role of the L-arginine-nitric oxide and protein kinase C pathways. **J Pharmacol Exp Ther.** v. 316, p. 789-796. 2006.
- Meotti, F. C. *et al.* Myricitrin as a substrate and inhibitor of myeloperoxidase: Implications for the pharmacological effects of flavonoids. **Free Radical Biol & Med.** v. 44, p. 109-120. 2008.

Mezadri, T. J. Batista, G. M. Repeated rat-forced swim test: Reducing the number of animals to evaluate gradual effects of antidepressants. **J. Neurosc Methods**. v. 195, n. 2, p. 200-205. 2011.

Middleton, J. E.; Kandaswami, C.; Theoharides, T. C. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. **Pharmacol Rev**. v. 52, p. 673-751. 2000.

Millan, M. J. Treatment of depressive states. **Pharmacology and Therapeutics**. v. 110, p. 135-370. 2006.

Mineur, Y. S.; Belzung, C.; Crusio, W. E. Effects of unpredictable chronic mild stress on anxiety and depression-like behavior in mice. **Behav Brain Res**. v. 175, p. 43-50. 2006.

Moncada, S.; Palmer, R. M. J.; Higgs, E. A. Nitric oxide: Physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacological Review**. v. 43, n.2, p. 109-142. 1991.

Monleon, S.D.; et al. Attenuation of sucrose consumption in mice by chronic mild stress and its restoration by imipramine. **Psychopharmacology**. v. 117, p. 435-457, 1995.

Moreau, J. L. et al. Chronic mild stress-induced anhedonia model of depression; sleep abnormalities and curative effects of electroshock treatment. **Behav Pharmacol**. v. 6, n. 7, p. 682-687. 1995.

Mössner, R. *et.al*. Consensus paper of the WFSBP Task Force on Biological Markers: biological markers in depression. **World J Biol Psychiatry**. v. 8, n. 3, p. 141-174. 2007.

Nemeroff, C. B. The corticotropin-releasing factor (CRF) hypothesis of depression: new findings and new directions. **Mol Psychiatry**. v. 4, n. 1, p. 336. 1996.

Nemeroff, C. B. New directions in the development of antidepressants: the interface of neurobiology and psychiatry. **Hum Psychopharmacol Clin Exp**. v. 17, p. 13–16. 2002.

Nestler, E. J.; Gould, E.; Manji, H. Preclinical models: Status of basic research in depression. **Biol Psychiatry**. v. 52, n. 6, p. 503-528. 2002a.

Nestler, E. J.; *et.al*. Neurobiology of Depression. **Neuron**. v. 34, p. 13-25. 2002b.

Owens, M. J.; Nemeroff, C. B. The role of HLC in the pathophysiology of affective disorders. **Laboratory and Clinical Studies**. v. 172. 1993.

Pereira M. *et al*. Myricitrin, a nitric oxide and protein kinase C inhibitor, exerts antipsychotic-like effects in animal models. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**. v. 35, n. 7, v. 1636-1644. 2011.

Porsolt, R. D. et al. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. **Nature**. v. 266, p. 730-732. 1977a.

Porsolt, R. D.; Bertin, A.; Jalfre, M. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. **Arch Int Pharmacodyn Ther**. v. 229, n. 2, p. 327. 1977b.

Price, M. L. *et.al*. Evidence for corticotropin-releasing factor regulation of serotonin in the lateral septum during acute swim stress: adaptation produced by repeated swimming. **Psychopharmacol**. v. 162, n. 4, p. 406-414. 2002.

Rampello, L., Nicoletti, G., Raffaele, R. Dopaminergic hypothesis for retarded depression: a symptom profile for predicting therapeutical response. **Acta Psychiatr. Scand**. v. 84, p. 552-554. 1991.

Raupp, I. M. *et.al*. Anxiolytic-like effect of chronic treatment with Erythrina velutina extract in the elevated plus-maze test. **J Ethnopharmacol**. v. 118, n. 2, p. 295-299. 2008.

Reul, J. M. H. M. *et.al*. Chronic treatment of rats with the antidepressant amitriptyline attenuates the activity of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical system. **Endocrinol**. v. 133, p. 312-320. 1993.

Reul, J. M. H. M. *et.al*. Hypothalamic-Pituitary-Adrenocortical Axis Changes in the Rat after Long-Term Treatment with the Reversible Monoamine Oxidase-A Inhibitor Moclobemide. **Neuro-endocrinology**. v. 60, n. 5, p. 509-519. 1994.

Réus, G. *et al*. Imipramine reverses alterations in cytokines and BDNF levels induced by maternal deprivation in adult rats. **Behav Brain Res**. v. 242, p. 40-46. 2013.

Ripoll, N. *et.al*. Antidepressant like effects in various mice strains in the tail suspension test. **Behav Brain Res**. v. 143, p. 193–200. 2003.

Ross, S. B.; Renyi, A. L. Inhibition of uptake of tritiated 5-hydroxytryptamine in brain tissue. **European J of Pharmacol**. v. 7, p. 270-277. 1969.

Saarelainen, T. *et.al*. Activation of the TrkB neurotrophin receptor is induced by antidepressant drugs and is required for antidepressant-induced behavioral effects. **J Neurosci**. v. 23, p. 349-357. 2003.

Sairanen, M. *et.al*. Brain-derived neurotrophic factor and antidepressant drugs have different but coordinated effects on neuronal turnover, proliferation, and survival in the adult dentate gyrus. **J Neurosci**. v. 25, p. 1089-1094. 2005.

Sapolsky, R. M. Why stress is bad for your brain. **Science**. v. 5276, n. 273, p. 749-750. 1996.

Schildkraut, J. J.; Gordon, E. K.; Durell, J. Catecholamine metabolism in affective disorders. I. Normetanephrine and VMA excretion in depressed patients treated with imipramine. **J Psychiatr Res**. v. 3, p. 213-228. 1965.

Shirayama, Y. *et.al.* Brain-derived neurotrophic factor produces antidepressant effects in behavioral models of depression. **J Neurosci.** v. 22, p. 3251-3261. 2002.

Schweizer, M. C.; Henniger, M. S. H.; Sillaber, I. Chronic Mild Stress (CMS) in Mice: Of Anhedonia, 'Anomalous Anxiolysis' and Activity. **PloS One.** v. 4, n. 1, e. 4326. 2009.

Skalisz, L. L.; Beijamini, V.; Andreatini, R. Effect of *Hypericum perforatum* on marble-burying by mice. **Phytother. Res.** v. 18, n. 5, p. 399-402, 2004.

Souza, F. G. M. Tratamento da depressao. **Rev Bras Psiquiatr.** v. 21, p. 18-23. 1999.

Steinert, J. R.; Chernova, T.; Forsythe, I. D. Nitric oxide signaling in brain function, dysfunction, and dementia. **Neuroscientist.** v. 14, n. 4, p. 435-452. 2010.

Stephen, E.; Zepf, R. A.; Woods, A. G. The Symptoms, Neurobiology and current pharmacological treatment of depression. **J. Neurosc Nur.** v. 37, n. 2, p. 102-107. 2005.

Steru L., Chermat R., *et.al.* The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. **Psychopharmacol.** n. 85, p. 367-370. 1985.

Suzuki, E. *et al.* Elevated plasma nitrate levels in depressive states. **J Affect Disord.** v. 63, p. 221-224. 2001.

Szabo, S. The creative and productive life of Hans Selye: a review of his major scientific discoveries. **Experientia.** v. 41, p. 564-567. 1985.

Takano, K. *et al.* Imipramine Induces Brain-Derived Neurotrophic Factor mRNA Expression in Cultured Astrocytes. **J Pharmacol Sci.** v. 120, p. 176-186. 2012.

Thierry, *et al.* Searching-Waiting Strategy: A Candidate for an Evolutionary Model of Depression? **Behav and Neural Biol.** v. 41, p. 180-189. 1984.

Treadway MT, Zald DH. Reconsidering anhedonia in depression: lessons from translational neuroscience. **Neurosci Biobehav Rev.** v. 35, p. 537-555. 2011.

Tsigos, C.; Chrousos, G. P. Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis, Neuroendocrine Factors and Stress. **J Psychosom Res.** v. 53, p. 865-871. 2002.

Varty, G. B.; Williams, M. E. C.; Hunter, J. C. The antidepressant-like effects of neurokinin NK1 receptor antagonists in a gerbil tail suspension test. **Behav Pharmacol.** v. 14, n. 1, p. 87-95. 2003.

Walsh, R. N.; Cummins, R. A. The open-field test: a critical review. **Psychol Bull.** v. 83, p. 482-504. 1976.



Wegener, C.; Volke, V.; Rosenberg, R. Endogenous nitric oxide decreases hippocampal levels of serotonin and dopamine in vivo. **Br J Pharmacol.** v. 130, p. 575-580. 2000.

Willner, P. Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: a 10-year review and evaluation. **Psychopharmacol.** v. 134, n. 4, p. 319-329. 1997.

Willner, P. Chronic mild stress (CMS) revisited: consistency and behavioural-neurobiological concordance in the effects of CMS. **Neuropsychobiology.** Vol. 52, n. 2, p. 90-110. 2005.

Yazir, Y.; Utkan, T.; Aricioglu, F. Inhibition of Neuronal Nitric Oxide Synthase and Soluble Guanylate Cyclase Prevents Depression-Like Behaviour in Rats Exposed to Chronic Unpredictable Mild Stress. **Basic & Clin Pharmacol & Toxicol.** v. 111, p. 154-160. 2012.

Yun, H.Y.; Dawson, V. L.; Dawson, T. M. Nitric oxide in health and disease of the nervous system. **Mol. Psychiatry.** v. 2, p. 300-310. 1997.

Zhou, Q. G. *et al.* Neuronal nitric oxide synthase contributes to chronic stress-induced depression by suppressing hippocampal neurogenesis. **J of Neurochemistry.** v. 103, p. 1843-1854. 2007.